نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص. ۹۶-۸۳

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 16, No. 1, Spring. 2018, p. 83-96

ارزیابی نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها در شناسایی مکان‌های مرتبط با صفات مهم زراعی و مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه در آفتابگردان روغنی (*Helianthus annuus* L.) تحت شرایط مزرعه‌ای

رشید پاک نیا[۱]- فرج اله شهریاری[۲*]- رضا درویش زاده[۳]- سعید ملک زاده[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۱

چکیده

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) یکی از گیاهان دانه روغنی است. پوسیدگی طوقه یکی از مهمترین بیماری‌های آفتابگردان در دنیا می‌باشد که در شرایط محیطی مناسب باعث از بین رفتن کل محصول می‌شود. در این مطالعه به منظور تجزیه ارتباطی صفات مهم زراعی و مقاومت به قارچ اسکلروتینیا (*Sclerotinia sclerotiorum*) تعداد ۱۰۰ لاین خالص آفتابگردان روغنی در مزرعه‌ای در روستای وقاصلوی سفلی از توابع شهرستان ارومیه در قالب طرح لاتیس ساده ۱۰×۱۰ در ۲ تکرار کشت شدند. پنج بوته از هر ژنوتیپ در هر تکرار با جدایه قارچی جمع‌آوری شده از گیاهان آفتابگردان آلوده همان مزرعه در سال قبل تلقیح شدند. صفات درصد پیشرفت آلودگی قارچی بعد از ۴، ۸ و ۱۲ روز، وزن صد دانه گیاه آلوده نشده، وزن صد دانه گیاه آلوده شده، عملکرد گیاه آلوده نشده، عملکرد گیاه آلوده شده، افت وزن صد دانه و افت عملکرد ارزیابی شدند. از طرفی پروفیل مولکولی جمعیت با ۲۸ آغازگر مبتنی بر رتروترنسپوزن (۷ جفت آغازگر IRAP و ۷ جفت آغازگر REMAP) تهیه شد. تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت به‌عنوان پیش نیاز تجزیه ارتباط با روش بیزین منجر به شناسایی ۲ زیر جمعیت شد. در تجزیه ارتباط بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM)، ۲۷ نشانگر رتروترنسپوزونی مرتبط با صفات مورد مطالعه شناسایی شدند. بیشترین تعداد نشانگر برای صفات درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۴ روز و عملکرد تک بوته گیاه آلوده شده شناسایی شد. در این مطالعه چندین مکان مشترک برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد. وجود نشانگرهای مشترک در میان برخی صفات بررسی شده می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه اطلاعات ارزشمندی در زمینه مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه ارائه می‌دهد که از این اطلاعات می‌توان در برنامه‌های مختلف و از جمله انتخاب به کمک نشانگر (MAS) در آفتابگردان استفاده نمود. می‌توان با توالی‌یابی مکان‌هایی که تغییرات قابل توجهی از صفات را توجیه می‌نمایند، ژن‌های کدکننده مقاومت به بیماری و صفات مهم زراعی را شناسایی نمود.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، ساختار جمعیت، عدم تعادل لینکاژی، نشانگرهای مولکولی، نقشه‌یابی ارتباطی

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) با 2n=2x=34 متعلق به خانواده *Asteraceae* می‌باشد و همراه با سویا، کلزا و بادام زمینی از جمله چهار محصول مهم دانه روغنی است که برای استحصال روغن خوراکی کشت می‌شود. روغن آفتابگردان به‌دلیل داشتن مقدار زیادی اسید چرب لینولئیک و فقدان کلسترول از مرغوبیت بالایی برخوردار است (Onemli and Gucer, 2010). در سال‌های اخیر روغن آفتابگردان به‌طور فزاینده برای اهداف صنعتی نیز استفاده می‌شود. سطح زیر کشت گیاه در دنیا ۲۵ میلیون هکتار و تولید سالیانه در حدود ۳۶ میلیون تن است (FAO). بیماری‌ها عامل اصلی محدودیت تولید آفتابگردان در دنیا می‌باشند و این گیاه میزبان بیش از ۴۰ بیمارگر می‌باشد (Gulya *et al*., 1997). عمده بیماری قارچی که به‌طور قابل توجهی باروری آفتابگردان را در شرایط محیطی مناسب کاهش

۱- دانش‌آموخته دکتری تخصصی بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: shahriari@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/gsc.v16i1.58597

می‌دهد، پوسیدگی اسکلروتینیایی است که اولین بار در سال ۱۸۷۳ معرفی شد (Purdy, 1979). قارچ عامل بیماری در تمام مناطق رشد آفتابگردان متداول و گزارش شده است. عامل بیماری متعلق به رده آسکومیست[1] بوده و توسط میسیلیا و اسکلروتیا در مرحله غیر جنسی تکثیر می‌شود (Masirevic and Gulya, 1992). گزارش شده است که این قارچ سالیانه منجر به خسارتی در حدود ۲۰۰ میلیون دلار در مزارع کشت آفتابگردان کشور آمریکا می‌شود (Bolton *et al*., 2006).

یکی از راهکارهای تضمین پایداری غذا برای جمعیت رو به افزایش جهان، کاهش خسارت ناشی از بیمارگرها می‌باشد (Campbell *et al*., 2002). بر این اساس هدف بیشتر برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان ایجاد مقاومت در برابر این بیماری می‌باشد. استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم بدون تردید یکی از اقتصادی‌ترین روش‌های کنترل بیماری به‌شمار می‌رود با این حال تاکنون ژنوتیپ کاملاً مقاوم در برابر بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی در آفتابگردان شناسایی نشده است هرچند که بعضی از ژنوتیپ‌ها مقاومت بیشتری در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر نشان داده‌اند (Carson, 1991). مقاومت عمودی تا به‌حال در مقابل قارچ اسکلروتینیا در آفتابگردان زراعی شناسایی نشده است ولی تحقیقات نشان داده است که مقاومت به‌صورت افقی یا پلی‌ژنیک می‌باشد (Hahn, 2002; Ronicke *et al*., 2005). در طی ۲۰ سال گذشته تلاش اصلی در تغییر روند روش‌های مبتنی بر گزینش فنوتیپی به سوی گزینش ژنوتیپی از طریق شناسایی جایگاه‌های صفات کمی در آفتابگردان بوده است. پیدایش تکنولوژی نشانگرهای DNA نقشه‌یابی مکان‌های ژنومی دخیل در مقاومت به بیماری‌ها را تسهیل کرده است. نشانگرهای مولکولی به علت خنثی بودن و نداشتن آثار مستقیم بر صفت و نیز به‌دلیل عدم تأثیرپذیری از عوامل محیطی، ابزار مناسبی برای مکان‌یابی ژن‌های مختلف و گزینش غیرمستقیم برای صفت هدف می‌باشند (Andaya *et al*., 1996). تجزیه پیوستگی[2] و تجزیه ارتباطی[3] روش‌هایی هستند که برای مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل‌کننده صفات کمی به‌کار می‌روند. در تجزیه ارتباطی با اتکا بر عدم تعادل پیوستگی، روابط واریانس فنوتیپی و چند شکلی ژنتیکی ژرم‌پلاسم بدون توسعه نقشه پیوستگی بررسی می‌شود و این روش به‌طور موفقیت‌آمیز در نقشه‌یابی صفات در گونه‌های مختلف گیاهی استفاده شده است (Breseghello and Sorrells, 2006). اولین مطالعه تجزیه ارتباطی در خصوص شناسایی نشانگرهای پیوسته با مناطق ژنومی درگیر در زمان گلدهی و ژن dwarf8 در ذرت بوده است (Thornsberry *et al*., 2001). عدم تعادل پیوستگی عبارت از ارتباط غیر تصادفی بین دو نشانگر یا دو ژن و یا یک نشانگر و یک ژن است. در جمعیت‌های طبیعی عدم تعادل می‌تواند توسط عوامل دیگری غیر از پیوستگی ژنی مانند جهش، مهاجرت، گزینش و رانده شدگی ژنتیکی طی دوره تکاملی یک جمعیت به‌وجود آید. ولی در جمعیت‌های مصنوعی تنها عامل ایجادکننده عدم تعادل، پیوستگی ژنی می‌باشد. موفقیت در تجزیه ارتباطی بستگی به ساختار عدم تعادل پیوستگی در ژنوم دارد (Flint-Garcia *et al*., 2003). در آرابیدوپسیس با استفاده از تجزیه ارتباطی چهار مکان دخیل در پاسخ به ورنالیزاسیون (FRI)، و سه مکان دخیل در مقاومت به بیماری (RPMI, RPS5, RPS2) شناسایی شده است (Aranzana *et al*., 2005). در مقایسه با نقشه‌یابی پیوستگی، تجزیه ارتباطی بهتر است زیرا منابع ژرم‌پلاسم موجود مانند کلکسیون‌های ژنتیکی و اصلاحی می‌توانند به‌طور مستقیم مورد استفاده قرار بگیرند (Myles *et al*., 2009; Speed *et al*., 2012; Wang *et al*., 2005). در تجزیه ارتباطی کل ژنوم با نشانگرهای مولکولی در جهت شناسایی QTLهای مرتبط با فنوتیپ صفت اسکن می‌شود (Rafalski, 2002a; Rafalski, 2002b; Zhu *et al*., 2008).

در آفتابگردان به‌عنوان یک گیاه دانه روغنی مهم و اقتصادی، پژوهش‌های زیادی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نواحی ژنومی دخیل در صفات مهم با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است (Anandhan *et al*., 2010; Darvishzadeh, 2012; Ebrahimi and Sarrafi, 2012; Mandel *et al*., 2013) که می‌توان به مکان‌یابی عوامل دخیل در کنترل صفات مهم زراعی (Eyvaznejad and Darvishzadeh, 2014)، عملکرد دانه (Abdi *et al*., 2012) و مکان‌یابی QTLهای مرتبط با تحمل سرما (Allinne *et al*., 2009) اشاره نمود. اخیراً در مطالعه‌ای با روش تجزیه ارتباطی یک ژن کاندید شناسایی شده است که ۲۰٪ از تغییرات فنوتیپی مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی در آفتابگردان را توجیه می‌کند (Fusari *et al*., 2012). هدف از این مطالعه، شناسایی نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون (IRAP و REMAP) پیوسته با پوسیدگی اسکلروتینیایی در آفتابگردان روغنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

یکصد لاین خالص آفتابگردان روغنی که از نقاط مختلف جهان (فرانسه، آمریکا، مجارستان و ایران) تهیه شده است (جدول ۱) در قالب یک طرح لاتیس ساده ۱۰×۱۰ در مزرعه آلوده به قارچ اسکلروتینیا در روستای وقاصلوی سفلی از توابع شهرستان ارومیه با دو تکرار کشت شد. هر تکرار شامل ۱۰ بلوک (ناقص) و هر بلوک شامل

1- Ascomycetes
2- Linkage analysis
3- Association analysis

۱۰ کرت زراعی بود. در هر کرت ۲ ردیف به طول ۵ متر با فاصله بین ردیف ۶۵ سانتی‌متر و فاصله بین بوته ۲۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. چهار روز قبل از کشت مزرعه آبیاری شد. پس از سبز شدن گیاهچه‌ها در مرحله ۴ برگی تنک کردن به منظور نگه داشتن یک بوته در هر کپه انجام گرفت. مبارزه با علف‌های هرز به‌صورت مکانیکی و بنابه نیاز انجام گرفت. بعد از رسیدن گیاهان به مرحله ۸ برگی کود اوره به مقدار ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار به‌صورت سرک بین ردیف‌ها پخش شد و بلافاصله آبیاری انجام گرفت. در حین گلدهی، طبق‌ها جهت جلوگیری از خسارت پرندگان با پاکت‌های سفید رنگ پوشانده شدند.

۵ بوته از هر ژنوتیپ در هر تکرار با جدایه قارچی جمع‌آوری شده از گیاهان آفتابگردان آلوده همان مزرعه در سال قبل تلقیح شدند و پیشرفت سرعت آلودگی بعد از ۴، ۸ و ۱۲ روز یادداشت‌برداری شد. همچنین بعد از برداشت طبق‌ها در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک، وزن ۱۰۰ دانه در گیاهان آلوده شده، وزن ۱۰۰ دانه در گیاهان آلوده نشده، عملکرد تک گیاه در گیاهان آلوده شده، عملکرد تک گیاه در گیاهان آلوده نشده، افت وزن ۱۰۰ دانه و افت عملکرد تک گیاه اندازه‌گیری و محاسبه شد.

جدول ۱- نام و منشاء لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه

Table 1- Name and origin of the studied oily sunflower lines

مرکز تحقیقاتی Research center	کشور Country	لاین Line	ردیف Row	مرکز تحقیقاتی Research center	کشور Country	لاین Line	ردیف Row
ASGROW	فرانسه	H100A/LC1064	51	IFVC	صربستان	803-1	1
ASGROW	فرانسه	H100A/90R78	52	USDA	آمریکا	HAR4	2
ASGROW	فرانسه	AS613	53	USDA	آمریکا	SDB1	3
ASGROW	فرانسه	H100A	54	USDA	آمریکا	SDR18	4
ASGROW	فرانسه	H209A/H566R	55	USDA	آمریکا	RHA274	5
ASGROW	فرانسه	H100A/83HR4	56	USDA	آمریکا	SDB3	6
ENSAT	فرانسه	H205A/H543R	57	USDA	آمریکا	HA335B	7
ENSAT	فرانسه	H209A/LC1064	58	USDA	آمریکا	PM1-3	8
ENSAT	فرانسه	AS5304	59	USDA	آمریکا	SDR19	9
ENSAT	فرانسه	LP-CSYB	60	USDA	آمریکا	HA337B	10
ENSAT	فرانسه	ENSAT-283	61	USDA	آمریکا	HA304	11
ENSAT	فرانسه	AS3211	62	USDA	آمریکا	RHA858	12
ENSAT	فرانسه	AS5306	63	USDA	آمریکا	RHA266	13
ENSAT	فرانسه	ENSAT-254	64	SPII	ایران	344	14
ENSAT	فرانسه	ENSAT-270	65	SPII	ایران	11*12	15
ENSAT	فرانسه	1009329 2 (100K)	66	SPII	ایران	26	16
ENSAT	فرانسه	1009337 (100K)	67	SPII	ایران	38	17
ENSAT	فرانسه	100935 0(100K)	68	SPII	ایران	346	18
ENSAT	فرانسه	ENSAT-699	69	SPII	ایران	260	19
ENSAT	فرانسه	AS3232	70	SPII	ایران	262	20
ENSAT	فرانسه	PAC2	71	SPII	ایران	1059	21
ENSAT	فرانسه	1009370-1 (100K)	72	SPII	ایران	36	22
ENSAT	فرانسه	1009370 3(100K)	73	SPII	ایران	30	23
ENSAT	فرانسه	ENSAT-695	74	SPII	ایران	28	24
ENSAT	فرانسه	AS6305	75	BRN	فرانسه	5DES20QR	25
ENSAT	فرانسه	AS0-1-POP-A	76	C.F	فرانسه	7CR16 D PRH6	26
ENSAT	فرانسه	CAY	77	ASGROW	فرانسه	110	27
ENSAT	فرانسه	703-CHLORINA	78	ASGROW	فرانسه	LC1064C	28
NOVARTIS	فرانسه	NS-R5	79	ASGROW	فرانسه	H158A*LC1064C	29
NOVARTIS	فرانسه	NS-B5	80	ASGROW	فرانسه	AS305	30
NOVARTIS	فرانسه	NSF1A4*R5	81	USDA	آمریکا	RHA265	31

NOVARTIS	فرانسه	NSF1A5*R5	82	ASGROW	فرانسه	H100B	32
NOVARTIS	فرانسه	AF1 POPA	83	ASGROW	فرانسه	SSD580	33
NOVARTIS	فرانسه	BF1 POPB	84	ASGROW	فرانسه	SSD581	34
INRAMONT	فرانسه	TMB51	85	ASGROW	فرانسه	5AS-F1/A2*R2	35
INRAMONT	فرانسه	QHP1	86	ASGROW	فرانسه	8ASB2	36
INRAMONT	فرانسه	D34	87	ASGROW	فرانسه	12ASB3	37
INRAMONT	فرانسه	H603R	88	ASGROW	فرانسه	15031	38
INRAMONT	فرانسه	PES	89	ASGROW	فرانسه	H158A/LC1064C	39
INRAMONT	فرانسه	SDB2	90	ASGROW	فرانسه	H543R/H543R	40
-	فرانسه	H049 C FSB	91	ASGROW	فرانسه	H156A/RHA274	41
-	مجارستان	F1250/03	92	ASGROW	فرانسه	H205A/83HR4	42
-	مجارستان	B454/03	93	ASGROW	فرانسه	H158A/H543R	43
RUSTICA	فرانسه	RT931	94	ASGROW	فرانسه	H209A/83HR4	44
RUSTICA	فرانسه	RT948	95	ASGROW	فرانسه	H157A/LC1064	45
Caussade semences	فرانسه	CSWW2X	96	ASGROW	فرانسه	H156A/H543R	46
Caussade semences	فرانسه	9CSAS	97	ASGROW	فرانسه	H100A/H543R	47
ENSAT	فرانسه	SF082	98	ASGROW	فرانسه	H100A/H543R	48
ENSAT	فرانسه	SF023	99	ENSAT	فرانسه	SF576	49
ENSAT	فرانسه	SF105	100	ENSAT	فرانسه	SF085	50

ارزیابی مولکولی

پروفیل مولکولی ژنوتیپ‌ها با نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه تهیه شد. استخراج DNA به روش CTAB از بافت تازه برگی گیاهچه‌های ۱۵ روزه انجام گرفت و کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و با استفاده از اسپکتوفتومتری تعیین شد. از ۲۸ آغازگر مبتنی بر رتروترنسپوزون شامل ۱۴ آغازگر IRAP و ۱۴ آغازگر REMAP استفاده شد (جدول ۲). واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، حاوی ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR (500 mM KCl, 500 mM Tris-HCl pH 8.4)، ۰/۷ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار (شرکت سیناژن، تهران، ایران)، ۰/۲۵ میلی‌مول از هر dNTP (Biofluxbiotech)، ۱/۱ واحد آنزیم تگ پلی مراز (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و ۱۰ میکرومول از هر آغازگر به همراه آب دیونیزه در دستگاه ترمال سایکلر انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌صورت: ۴ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۶ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (جهت واسرشت‌سازی)، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال اختصاصی مربوط به هر آغازگر (جهت اتصال) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر ۰/۵x TBE با ولتاژ ۶۵ ولت به مدت ۳ ساعت انجام و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. برای تعیین اندازه باندها از نشانگر O'GeneRuler (شرکت فرمنتاز) استفاده شد.

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 2- Name and sequence of primers used in the present study

آغازگر رتروترنسپوزون Retrotransposon primer	توالی آغازگر (۳'→۵') Primer sequences (5'→3')	آغازگر ISSR ISSR primer	توالی آغازگر (۳'→۵') Primer sequences (5'→3')
LTR- 1061	AGAGGGGAATGTGGGGTTTCC	UBC-818	CACACACACACACACAG
LTR-1062	TCTCTATTTATAGCCGGAGAGGTG	UBC-826	ACACACACACACACACC
LTR-1063	GATCCGGTTTCACGGGACTTAC	UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
LTR-1064	CGAAGAACAAACCGAATCACC	UBC-857	ACACACACACACACACYG
LTR-1065	AGCCTCTGAAAGACTCGTTCG	A13	GTGTGTGTGTGTCC
CF	GGTTTAGGTTCGTAATCCACCGCG	UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA
CR	ACAGACACCAGTGGCACCAAC	UBC-864	ATGATGATGATGATGATG
UF(U81)	TAACGGTGTTCTGTTTTGCAGG	UBC-880	GGAGAGGAGAGGAGA
UR1(U82)	AGAGGGGAATGTGGGGTTTCC	-	-

تجزیه و تحلیل داده‌ها

باندهای حاصل از نشانگرها به‌صورت یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند) امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت استفاده شد. ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیرجمعیت‌های مناسب و تهیه ماتریس Q[1] با استفاده از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure نسخه ۲/۳۴ انجام گرفت (Rosenberg *et al*., 2002). این روش هریک از ژنوتیپ‌ها را طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. مقادیر اولیه K (زیرجمعیت فرضی اولیه) بین ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هرکدام از زیرجمعیت‌ها پنج تکرار منظور گردید برای این منظور از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلل‌ها با ۱۰۰۰۰۰ مرتبه اجرا در زمان[2] و ۱۰۰۰۰۰ MCMC[3] استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت) یک ماتریس به نام Q را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در یکی از زیرجمعیت‌ها است. در بارپلات حاصل، وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به آن کلاستر بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن کلاستر نسبت داده می‌شود، ولی در صورتی‌که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد، به‌عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) در نظر گرفته می‌شود (Spataro *et al*., 2011). تعداد واقعی زیرجمعیت توسط لگاریتم Likelihood برای هر K: LnP(D)=L(K) تعیین می‌شود (Rosenberg *et al*., 2002). از آن‌جایی‌که توزیع LnP(D) معمولاً عدد دقیق و واضحی از K واقعی را نشان نمی‌دهد، ΔK مبنی بر برآورد ثانویه تغییر در Likelihood جهت برآورد دقیق مقدار واقعی K استفاده می‌شود (Evanno *et al*., 2005). شناسایی نشانگرهای مرتبط و دارای ارتباط معنی‌دار با صفات مورد ارزیابی بر اساس مدل خطی عمومی[4] وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب ساختار به عنوان کوواریت) و مدل خطی مخلوط[5] وابسته به ماتریس K+Q (ماتریس ضرایب ساختار جمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی) که اثر نشانگر و ساختار جمعیت ثابت ولی اثر خویشاوندی تصادفی در نظر گرفته می‌شود (Bradbury *et al*., 2007) در نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت.

1- Q matrix
2- Burn in time
3- Markov Chain Monte Carlo
4- GLM: General linear model
5- MLM: Mixed linear model

نتایج و بحث

آماره‌های توصیفی

جنبه‌های مهم توزیع مشاهدات صفات مورد مطالعه شامل شاخص‌های حداقل، حداکثر، میانگین و ضریب تغییرات در جدول ۳ ارائه شده است. ضریب تغییرات صفات مورد مطالعه بین ۲۰/۴۴ تا ۷۸/۴۸ درصد متغیر بود. بیشترین ضریب تغییرات در افت عملکرد تک بوته و افت وزن ۱۰۰ دانه مشاهده شد (جدول ۳). به دلیل این که پارامتر ضریب تغییرات تحت تأثیر واحد اندازه‌گیری صفت و یا دامنه تغییرات آن قرار نمی‌گیرد، نسبت به دیگر معیارهای تنوع از اهمیّت بیشتری برخوردار است. با توجه به بالا بودن ضریب تغییرات برای بیشتر صفات و اهمیت آن در گزینش ژنوتیپ‌های برتر، جمعیت لاین‌های مورد مطالعه می‌تواند به‌عنوان یک منبع اصلاحی خوب در نظر گرفته شود. بر مبنای صفت درصد پیشرفت آلودگی در مراحل مختلف یادداشت‌برداری، چهار لاین (NSF1-A4×R5، IRANI-28، B454/03 و ENSAT-254) به‌ترتیب با کمترین درصد پیشرفت آلودگی (۲۱/۶۷، ۲۵/۰۰، ۳۶/۴۶، ۳۶/۷۵) مقاومت جزئی در برابر قارچ عامل بیماری نشان دادند.

همبستگی‌های فنوتیپی

شناخت روابط بین صفات و برهم‌کنش آنها حداقل از دو جنبه اهمیت دارد، اول برای اصلاح غیر مستقیم عملکرد و دوم اینکه اصلاح‌گر درمی‌یابد که با اصلاح یک صفت، چه صفات دیگری خود به خود تغییر خواهند نمود. لذا در برنامه‌ریزی برای گزینش توجه به همبستگی صفات از اهمیت اساسی برخوردار است. همبستگی جزئی میزان ارتباط بین دو متغیر تصادفی را در حالی‌که تأثیر دیگر متغیرها حذف شده‌اند اندازه‌گیری می‌کند. صفات مربوط به درصد پیشرفت آلودگی همبستگی جزئی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ با یکدیگر نشان دادند. هر سه صفت درصد پیشرفت بیماری با سایر صفات همبستگی جزئی منفی ولی غیر معنی‌دار نشان دادند. همبستگی منفی نشان‌دهنده کاهش عملکرد با افزایش درصد پیشرفت بیماری می‌باشد. بر اساس نتایج تجزیه همبستگی جزئی بیشترین همبستگی مثبت بین عملکرد تک بوته گیاهان آلوده شده با عملکرد تک بوته گیاهان آلوده نشده و همچنین افت عملکرد ۱۰۰ دانه با افت عملکرد تک بوته مشاهده شد.

ارزیابی ساختار ژنتیکی

تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیر جمعیت‌های مناسب با استفاده از ۲۳۱ نشانگر پلی مورف حاصل از ۱۴ آغازگر IRAP و ۱۴ آغازگر REMAP در نرم‌افزار Structure انجام

گرفت (شکل ۱ و ۲). با توجه به اینکه مقادیر حداکثر ΔK در K=۲ به‌دست آمد، بنابراین ژنوتیپ‌های آفتابگردان مورد مطالعه به احتمال قوی دارای ۲ زیرجمعیت می‌باشند (شکل ۱). بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات (شکل ۲)، ۱۵ ژنوتیپ (۱۵٪) متعلق به زیر ساختار اول (سبز) و ۵۱ ژنوتیپ (۵۱٪) متعلق به زیر ساختار دوم (قرمز) می‌باشند و ۳۴٪ از لاین‌ها دارای سهم عضویت کمتر از ۰/۷ می‌باشند یعنی به ساختار مخلوط تعلق دارند. در مطالعات تجزیه ارتباط در حالت ایده‌آل نباید ساختاری در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد، یعنی جمعیت نباید به لحاظ ساختاری به زیر گروه‌هایی تقسیم شود، زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند عامل بازدارنده در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد باشد و در صورتی‌که اثر عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در نظر گرفته نشوند، نتایج مثبت کاذب به‌وجود خواهد آمد (Carson, 1991). استفاده از مدل‌های آماری که اطلاعات مرتبط با ساختار ژنتیکی جمعیت (اطلاعات ماتریس Q) را در نظر می‌گیرند میزان خطا را کاهش می‌دهد.

مکان‌یابی ارتباطی

چالش اصلی در تجزیه ارتباط متمایز ساختن روابط حقیقی بین نشانگرها و صفات از روابط کاذب ناشی از ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی است. در این مطالعه برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات در آفتابگردان از تجزیه ارتباط به روش مدل خطی مخلوط (MLM) و مدل خطی عمومی (GLM) استفاده شد. در مدل خطی عمومی (GLM) تنها ساختار جمعیت، ولی در مدل خطی مخلوط (MLM) علاوه بر ماتریس ساختار جمعیت (ماتریس Q)، ماتریس روابط خویشاوندی (ماتریس K) بین افراد جمعیت نیز در تجزیه ارتباط به‌عنوان کواریت در نظر گرفته می‌شوند و بنابراین ارتباطات و پیوستگی‌های دروغین بین نشانگر و صفت به حداقل می‌رسد. نشانگرهای پیوسته با ۹ صفت بررسی شده با استفاده از دو مدل ارتباطی در جدول ۵ ارائه شده است. بر اساس مدل GLM، ۲۵ نشانگر که ارتباط معنی‌داری (P<۰/۰۱) با صفات مورد مطالعه داشتند، شناسایی شدند. تعداد ۵ مکان مرتبط با درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۴ روز، ۴ مکان مرتبط با پیشرفت آلودگی بعد از ۸ روز، ۳ مکان مرتبط با وزن صد دانه گیاه آلوده نشده، ۳ مکان مرتبط با وزن صد دانه گیاه آلوده شده، ۵ مکان مرتبط با عملکرد تک بوته گیاه آلوده شده، ۳ مکان مرتبط با افت عملکرد وزن صد دانه و ۲ مکان مرتبط با افت عملکرد تک گیاه شناسایی گردید. برای صفات درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۱۲ روز تعداد ۹ نشانگر و عملکرد تک بوته گیاه آلوده نشده تعداد ۷ نشانگر در سطح ۵٪ شناسایی شد. مقدار R^2 (درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده) در محدوده ۸/۴ (cr9) تا ۲۴/۱ درصد (62655) متغیر بود. نشانگر 64a133 در سطح احتمال ۱٪ برای هر دو صفت عملکرد تک بوته گیاه آلوده شده و افت عملکرد صد دانه به صورت مشترک شناسایی شد. توالی‌یابی نشانگرهای آگاهی بخش با R^2 بالا و مقایسه آنها با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی کارایی استفاده از آنها در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر و همسان‌سازی ژن بر اساس نقشه را بالا می‌برد.

جدول ۳- آماره‌های توصیفی برای صفات ارزیابی شده در لاین‌های آفتابگردان روغنی

Table 3- Simple statistics for studied traits in oily sunflower lines

صفات Traits	±SE میانگین Mean ± SE	حداقل Minimum	حداکثر Maximum	ضریب تغییرات CV%
درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۴ روز Percentage of necrotic area after 4 days	65.43±2.15	15.00	100.00	31.81
درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۸ روز Percentage of necrotic area after 8 days	74.54±2.03	20.00	100.00	26.47
درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۱۲ روز Percentage of necrotic area after 12 days	82.29±1.73	25.00	100.00	20.44
وزن ۱۰۰ دانه آلوده نشده 100 seeds weight of non contaminated plants	5.78±0.20	2.10	10.75	32.98
وزن ۱۰۰ دانه آلوده شده 100 seeds weight of contaminated plants	4.86±0.18	1.55	9.85	35.26
افت وزن ۱۰۰ دانه 100 seeds weight loss	24.95±2.23	1.42	73.71	72.51
عملکرد تک بوته آلوده نشده Yield per plant in non contaminated plants	38.22±2.00	8.30	113.1	49.70
عملکرد تک بوته آلوده شده Yield per plant in contaminated plants	29.54±1.63	2.75	66.14	53.10
افت عملکرد تک بوته Per plant yield loss	29.91±2.83	0.00	89.91	78.48

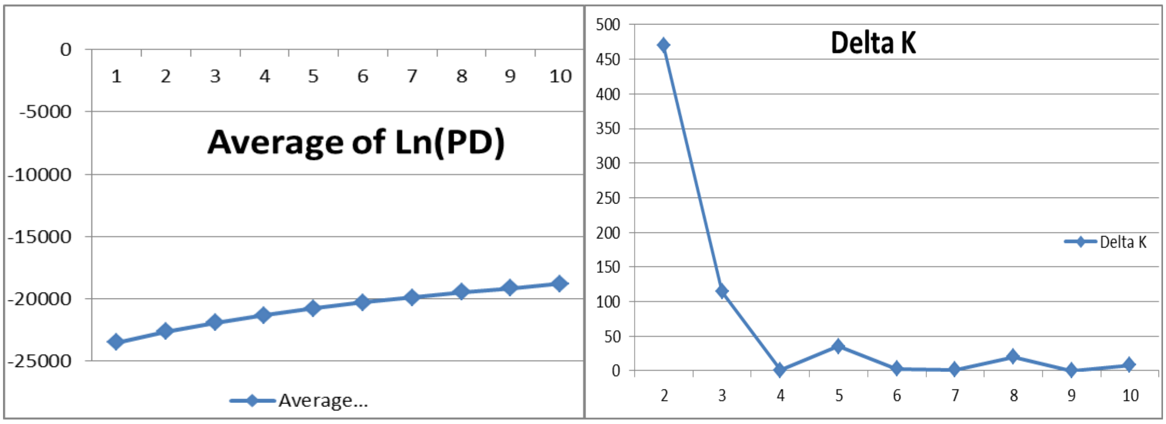
CV: Coefficient of variation

جدول ٤- ضرایب همبستگی جزئی صفات مورد مطالعه در لاین‌های خالص آفتابگردان

Table 4- Partial correlation coefficients among studied traits in oily sunflower lines

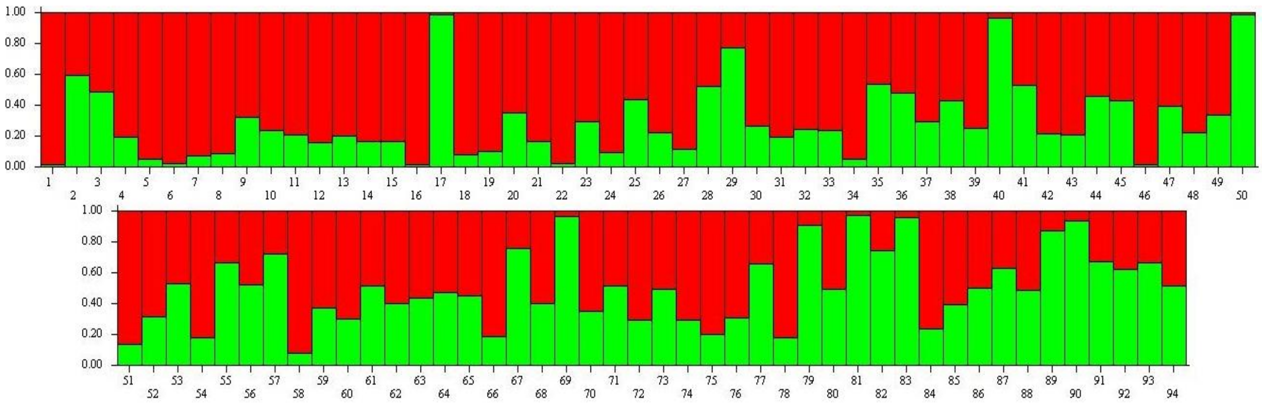
صفات Traits	درصد پیشرفت آلودگی بعد از ٤ روز Percentage of necrotic area after 4 days	درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۸ روز Percentage of necrotic area after 8 days	درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۱۲ روز Percentage of necrotic area after 12 days	وزن ۱۰۰ دانه آلوده نشده 100 seeds weight of non contaminated plants	وزن ۱۰۰ دانه آلوده شده 100 seeds weight of contaminated plants	عملکرد تک بوته آلوده نشده Yield per plant in non contaminated plants	عملکرد تک بوته آلود شده Yield per plant in contaminated plants	افت عملکرد ۱۰۰ دانه 100 seeds weight loss
درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۸ روز Percentage of necrotic area after 8 days	0.86**	-	-	-	-	-	-	-
درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۱۲ روز Percentage of necrotic area after 12 days	0.76**	0.81**	-	-	-	-	-	-
وزن ۱۰۰ دانه آلوده نشده 100 seeds weight of non contaminated plants	-0.02 n.s	-0.00 n.s	0.05 n.s	-	-	-	-	-
وزن ۱۰۰ دانه آلوده شده 100 seeds weight of contaminated plants	0.00 n.s	0.01 n.s	0.04 n.s	0.67**	-	-	-	-
عملکرد تک بوته آلوده نشده Yield per plant in non contaminated plants	-0.02 n.s	0.06 n.s	0.10 n.s	0.61**	0.43**	-	-	-
عملکرد تک بوته آلوده شده Yield per plant in contaminated plants	0.04 n.s	0.05 n.s	0.10 n.s	0.43 n.s	0.65**	0.72**	-	-
افت عملکرد ۱۰۰ دانه 100 seeds weight loss	-0.03 n.s	0.00 n.s	0.02 n.s	0.22 n.s	-0.54 n.s	0.09 n.s	-0.36**	-
افت عملکرد تک بوته Per plant yield loss	-0.02 n.s	0.01 n.s	0.00 n.s	0.14 n.s	-0.40**	0.17 n.s	-0.50**	0.68**

* و ** اختلاف معنی‌دار به‌ترتیب در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪، n.s اختلاف غیر معنی‌دار در سطح ۵٪.



شکل ۱- نمودارهای دوطرفه برای تعیین تعداد زیرجمعیت‌ها در ژرم‌پلاسم آفتابگردان روغنی مورد مطالعه (K=2) بر اساس نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون در نرم‌افزار Structure

Figure 1- Bilateral graphs for determining optimum subpopulations in studied oily sunflower germplasm (K=2) based on retrotransposon markers in Structure software



شکل ۲- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian ۱۰۰ لاین آفتابگردان روغنی مورد مطالعه بر اساس مکان‌های ژنی حاصل از دو نشانگر IRAP و REMAP. هر رنگ یک زیرجمعیت را نشان می‌دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به‌ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به کلاستر یا زیرجمعیت را نشان می‌دهد

Figure 2- Bayesian model based-cluster analysis of 100 oily sunflower lines by using IRAP and REMAP markers dada. Numbers on the y-axis indicate the membership coefficient (Q) and on the x-axis indicate the individual's number.

در تجزیه ارتباط بر اساس مدل MLM در سطح احتمال (P<۰/۰۱) در مجموع ۲۷ مکان ژنی مرتبط با ۹ صفت مورد مطالعه شناسایی شدند (جدول ۵). از کل مکان‌های مرتبط با صفات مورد ارزیابی به‌ترتیب ۵ و ۴ مکان ارتباط معنی‌داری با صفات درصد پیشرفت سطح آلودگی بعد از ۴ و ۸ روز، ۲ و ۴ مکان ژنی مرتبط با صفات وزن صد دانه گیاه آلوده نشده و شده، ۲ و ۵ مکان مرتبط با صفات عملکرد تک بوته گیاه آلوده نشده و شده و ۲ و ۳ مکان مرتبط با صفات افت عملکرد صد دانه و تک بوته شناسایی گردید. در مدل MLM نیز برای صفت درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۱۲ روز تعداد ۹ نشانگر در سطح (P<۰/۰۵) شناسایی گردید. در مدل MLM نشانگر 618403 به‌طور مشترک برای هر دو صفت درصد پیشرفت بیماری بعد از ۸ روز و افت وزن صد دانه در سطح احتمال ۱٪ شناسایی شد.

شناسایی نشانگرهای مشترک برای برخی صفات بررسی شده در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (Jun *et al*., 2008). شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازد (Tuberosa *et al*., 2002).

در بسیاری از مناطق رشد آفتابگردان در دنیا، اسکلروتینیا (*Sclerotinia sclerotiorum*) یکی از بیماری‌های مهم آفتابگردان می‌باشد. در مطالعه‌ای مکان‌های کمی (QTL) مقاومت به بیماری پوسیدگی طبق در دو ژرم‌پلاسم آفتابگردان آمریکایی شناسایی شد. هرکدام از ۵ QTL شناسایی شده در حدود ۱۲/۹٪ از تغییرات فنوتیپی را توجیه می‌نمودند. بر اساس اظهار محققین این QTL ها می‌توانند

در برنامه اصلاح آفتابگردان مفید باشند (Yue *et al*., 2008). در یک مطالعه دیگر، حساسیت ۳۵۱ خانواده F_3 حاصـل از تلاقـی بـین یـک لاین اینبرد مقاوم از خزانه ژنی NDBLOS و لاین حساس CM265 به بیماری پوسیدگی ساقه ارزیابی شد.

جدول ۵- نشانگرهای رتروترنسپوزون پیوسته با صفات ارزیابی شده در لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه بر اساس مدل‌های GLM و MLM

Table 5- Identification of retrotransposon markers associated with studied traits in oily sunflower lines by using general and mixed linear models

صفت Trait	نشانگر رتروترنسپوزون Retrotransposon marker	مدل GLM در سطح 1٪ و 5٪ P-Value	R^2	نشانگر رتروترنسپوزون Retrotransposon marker	مدل MLM در سطح 1٪ و 5٪ F-Value	P-Value
درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۴ روز Percentage of necrotic area after 4 days	62655	0.000	0.241	62655	22.45	0.000
	CR5	0.001	0.154	CR5	13.97	0.000
	648403	0.001	0.154	648403	11.92	0.001
	UFUR15	0.004	0.133	618402	9.36	0.003
	618402	0.008	0.122	UR18402	8.68	0.004
درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۸ روز Percentage of necrotic area after 8 days	618572	0.000	0.180	64653	11.92	0.001
	64653	0.002	0.167	618403	8.17	0.005
	64654	0.007	0.142	618572	8.06	0.006
	CFCR6	0.008	0.131	CFCR6	7.28	0.009
درصد پیشرفت آلودگی بعد از ۱۲ روز Percentage of necrotic area after 12 days	UR16	0.016	0.071	651	6.41	0.0133
	618401	0.017	0.066	UR16	6.29	0.014
	651	0.019	0.082	618401	5.96	0.017
	648407	0.023	0.061	CF8261	5.57	0.021
	648408	0.024	0.060	648408	5.38	0.023
افت عملکرد تک بوته Per plant yield loss	618575	0.026	0.060	618575	5.27	0.024
	627	0.027	0.089	UFUR111	5.21	0.026
	CF8261	0.029	0.066	648404	4.43	0.038
	648404	0.041	0.049	658183	4.21	0.043
	648574	0.007	0.106	63644	9.56	0.003
	63644	0.007	0.096	CF3	8.23	0.005
				CRUR14	7.21	0.009

صفت Trait	نشانگر رتروترنسپوزون Retrotransposon marker	مدل GLM در سطح 1٪ و 5٪ P-Value	R^2	نشانگر رتروترنسپوزون Retrotransposon marker	مدل MLM در سطح 1٪ و 5٪ F-Value	P-Value
عملکرد تک بوته آلوده نشده Yield per plant in non contaminated plants	648185	0.017	0.125	648185	7.88	0.006
	618187	0.019	0.136	618187	7.22	0.009
	61658	0.024	0.119			
	CR9	0.023	0.112			
	655	0.024	0.112			
	CF8261	0.034	0.103			
	CRUR11	0.050	0.106			
وزن صد دانه آلوده نشده 100 seeds weight of non contaminated plants	651	0.005	0.111	651	9.17	0.003
	CR9	0.010	0.084	CR9	7.05	0.009
وزن صد دانه آلوده شده 100 seeds weight of contaminated plants	CFCR2	0.010	0.094			
	648184	0.004	0.115	64A131	9.71	0.003
	648402	0.008	0.112	648184	9.28	0.003
	64A131	0.008	0.103	648402	7.68	0.007
				CF8261	7.14	0.009
عملکرد تک بوته آلوده شده Yield per plant in contaminated plants	UR18403	0.001	0.169	UR18403	11.89	0.001
	64A1311	0.002	0.152	64A1311	10.98	0.002
	64A133	0.003	0.141	64A133	9.54	0.003
	CF8182	0.004	0.162	618571	8.50	0.005
	618571	0.005	0.126	CF8182	8.19	0.006
افت وزن صد دانه 100 seeds weight loss	618189	0.007	0.121	618189	8.63	0.005
	64A133	0.009	0.112	618403	7.39	0.008
	618403	0.010	0.111			

در این مطالعه، ارزیابی در شرایط آلودگی مصنوعی در مزرعه طی دو فصل زراعی انجام گرفت. برای ۳ صفت مرتبط با مقاومت (پوسیدگی برگ، پوسیدگی ساقه و سرعت رشد قارچ) و دو صفت مورفولوژیک واریانس ژنوتیپی بسیار معنی‌دار بود و همبستگی بالایی بین صفات مشاهده شد. QTLهایی برای هر سه صفت مقاومت شناسایی شد اما هر کدام از QTLها دارای اثرات کوچکی بودند (Micic *et al*., 2004). در مطالعه دیگر ژنتیک مقاومت به پوسیدگی ساقه ناشی از *S. sclerotiorum* در جمعیت حاصل از تلاقی بین دو لاین مقاوم ($NDBLOS_{sel}$×K04) بررسی شد. نتایج نشان داد که مقاومت به اسکلروتینیا کمی و مناطق ژنومی مختلفی در این فرآیند دخیل می‌باشند و دو مکان کمی برای مقاومت به پوسیدگی ساقه شناسایی شد که یکی از آنها QTL بزرگ اثر بود (Wurschum *et al*., 2014).

پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی صفات کمی، محتمل‌ترین توجیه برای وجود رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی است و استفاده از پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی، فرآیند اصلاح نباتات را تسریع کرده است به‌طوری‌که به جای ارزیابی صفات، گزینش غیرمستقیم به کمک نشانگرهای پیوسته صورت می‌گیرد. نقشه‌یابی ارتباطی نقش کلیدی در شناسایی عوامل مؤثر در تغییرات کمی بازی می‌کند. اساس طراحی و انجام روش‌های تجزیه ارتباط نیاز به درک و فهم ساختار LD در یک گونه گیاهی است (Flint-Garcia *et al*., 2003). تجزیه ژنتیک صفات کمی از طریق نقشه‌یابی ارتباطی در گیاهان زراعی مختلف مانند جو (Inostroza *et al*., 2008)، آرابیدوپسیس (*Arabidopsis*) (Aranzana *et al*., 2005)، سورگوم (Sukumaran *et al*., 2012) و گندم (Liue *et al*., 2010) انجام شده است. در تحقیقی تجزیه ارتباط بین ۱۱ صفت زراعی در گندم و ۵۱۹ نشانگر شامل ۲۲۱ نشانگر SSR، ۴۳ نشانگر SAMPL و ۲۲۵ نشانگر AFLP بررسی شد. در نشانگرهای SSR بیشترین میزان ضریب تبیین مربوط به صفت شاخص برداشت با ۲۸٪ و در نشانگر SAMPL بیشترین میزان ضریب تبیین مربوط به صفت شاخص برداشت با ۲۰٪ و در نشانگرهای AFLP بیشترین میزان ضریب تبیین مربوط به صفت تعداد گلچه در خوشه با ۲۹٪ بود (Roy *et al*., 2006).

در تحقیقی واکنش ۹۴ لاین اینبرد آفتابگردان تحت شرایط مزرعه‌ای به‌صورت مصنوعی در مقابل قارچ *Sclerotinia scleritiorum* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۴۳ ژن کاندید بر اساس مطالعات پروفایل رونوشت در آفتابگردان و کلزا آلوده شده با قارچ *S. sclerotiorum* انتخاب شدند. بررسی ارتباط بین فنوتیپ پوسیدگی طبق توسط پاتوژن قارچی و چند شکلی هاپلوتایپ در ژن‌های کاندید با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندید *HaRIC-B* و وقوع پوسیدگی طبق توسط پاتوژن قارچی در سطح ۱٪ وجود دارد (Fusari *et al*., 2012). در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ آفتابگردان از کشورهای مختلف دنیا با استفاده از ۳۸ نشانگر SSR با هدف شناسایی نشانگرهای مرتبط با مکان‌های ژنی درگیر در مقاومت به پوسیدگی ساقه در برابر ۷ جدایه بیمارگر قارچی *S. sclerotiorum*، ارزیابی شد. در این مطالعه ۵ نشانگر اختصاصی برای مقاومت جزئی در برابر جدایه‌ها شناسایی شد که دو تا از نشانگرها بین بعضی از جدایه‌ها مشترک بودند. نشانگر ORS1256 برای دو جدایه SSU35 و SSU87 و نشانگر ORS49 برای دو جدایه SSU53 و SSU55 به‌طور مشترک شناسایی شدند (Darvishzadeh, 2012). در یک تحقیق مکان‌های ژنی دخیل در مقاومت به پوسیدگی ساقه در آفتابگردان با استفاده از ۲۶۰ ژنوتیپ و هفت ژن کاندید شناسایی شد. در این مطالعه ۲ ژن به‌صورت معنی‌دار (P<۰/۰۱) در حدود ۷/۴٪ از تغییرات فنوتیپی را در جمعیت توجیه می‌نمودند (Talukder *et al*., 2014). فوزاری و همکاران (Fusari *et al*., 2012) با استفاده از مدل خطی یک ژن کاندید برای مقاومت به بیماری اسکلروتینیا در آفتابگردان شناسایی کردند که ۲۰ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه می‌نمود.

اصلاح مقاومت آفتابگردان در مقابل *S. sclerotiorum* به‌دلیل توارث پیچیده این صفت مشکل می‌باشد ولی منابع مقاومت و نشانگرهای شناسایی شده در این مطالعه در جهت بهبود و تولید ژنوتیپ‌های مقاوم امید بخش می‌باشند. بر پایه نتایج این تحقیق چهار لاین (B454/03، ENSAT-254، NSF1-A4×R5 و ایرانی با کد ۲۸) با سطوح مقاومت و منشاء ژنتیکی مختلف می‌توانند به‌عنوان والدین هیبرید (مقاوم) مورد استفاده قرار گیرند. در صورت اجرای آزمایش‌های تکمیلی از جمله اجرای آزمایش در چند محیط و برآورد تغییرات ناشی از آثار متقابل ژنوتیپ در محیط و همچنین تأیید نشانگرهای شناسایی شده، از نشانگرهای شناسایی شده می‌توان در برنامه‌های اصلاحی از جمله انتخاب به کمک نشانگر بهره برد. می‌توان با توالی‌یابی مکان‌هایی که تغییرات قابل توجهی از صفات را توجیه می‌نمایند، ژن‌های کدکننده مقاومت به بیماری و صفات مهم زراعی را شناسایی نمود.

نتیجه‌گیری

این پژوهش با استفاده از مجموعه متنوعی از لاین‌های آفتابگردان روغنی و آغازگرهای رتروترنسپوزون به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت به بیماری انجام گرفت. با استفاده از مدل خطی مخلوط (MLM) در مجموع ۲۷ مکان مرتبط با ۹ صفت

مورد مطالعه شناسایی شدند. مکان‌های ژنی مرتبط با صفات زراعی و مقاومت به بیماری را می‌توان از طریق تلاقی‌های کلاسیک به زمینه ژنتیکی سایر ژنوتیپ‌ها انتقال داد. با تبدیل نشانگرهای شناسایی شده در تحقیق حاضر به نشانگرهای SCAR می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی به منظور شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی، تهیه ارقام هیبرید و نیز گزینش به کمک نشانگر MAS[1] استفاده نمود.

References

1. Abdi, N., Darvishzadeh, R., Jafari, M., Pirzad, A., and Haddadi, P. 2012. Genetic analysis and QTL mapping of agro-morphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under two contrasting water treatment conditions. Plant Omics 5 (2): 149-158.
2. Allinne, C., Maury, P., Sarrafi, A., and Grieu, P. 2009. Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. Plant Science 177: 349-359.
3. Anandhan, T., Manivannan, N., Vindhiyaman, P., and Jeykaumar, P. 2010. Single marker analysis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Electronic Journal of Plant Breeding 1 (4): 1227-1234.
4. Andaya, V. C., Tabanao, D., Maramara, G., and Sebastian, L. S. 1996. Correlation of molecular diversity with heterosis in nine lowland rice. Philippine Journal of Crop Science 21: 4.
5. Aranzana, M. J., Kim, S., Zhao, K., Bakker, E., Horton, M., Jakob, K., Lister, C., Molitor, J., Shindo, C., Tang, C., Toomajian, C., Traw, B., Zheng, H., Bergelson, J., Dean, C., Marjoram, P., and Nordborg, M. 2005. Genome-wide association mapping in Arabidopsis identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. PLoS Genet 1(5): e60.
6. Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., and Nelson, B. D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology 7: 1-166.
7. Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Randoss, Y., and Buckler, E. S. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23: 2633-2635.
8. Breseghello, F., and Sorrells, M. E. 2006. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Genetics 172: 1165-1177.
9. Campbell, M. A., Fitzgerald, H. A., and Ronald, P. C. 2002. Engineering pathogen resistance in crop plants. Transgenic Research 11: 599-613.
10. Carson, M. L. 1991. Relationship between phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. Plant Disease 75: 1150-1153.
11. Darvishzadeh, R. 2012. Association of SSR markers with patial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates to sunflower. Australian Journal of Crop Science 6 (2): 276-282.
12. Ebrahimi, A., and Sarrafi, A. 2012. Genetic Variability and identification of markers in gamma-irradiation induced mutants of sunflower under water stress condition. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 1 (2): 1-8.
13. Evanno, G., Reganut, E., and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14: 2611-2620.
14. Eyvaznejad, N., and Darvishzadeh, R. 2014. Identification of QTLs for grain yield and some agro-morphological traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using SSR and SNP markers. Journal of Plant Molecular Breeding 2 (2): 68-87
15. Flint-Garcia, S. A., Thornsberry, J. M., and Buckler, E. S. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. Annual Review of Plant Biology 54: 357-374.
16. Fusari C. M., Rienzo J. A. D., Troglia C., Nishinakamasu V., Moreno M. V., Maringolo C., Quiroz F., Álvarez D., Escande A., Hopp E., Heinz R., Lia V. V., and Paniego N. B. 2012. Association mapping in sunflower for sclerotinia head rot resistance. BMC Plant Biology 12 (93): 1-13.
17. Gulya, T. J., Rashid, K. Y., and Masirevic, S. N. 1997. Sunflower diseases. In Sunflower technology and production, Madison, Wisconsin, USA, p. 263-379.
18. Hahn, V. 2002. Genetic variation for resistance to Sclerotinia head rot in sunflower inbred lines. Field Crops Research 77: 153-159
19. Inostroza, L., Pozo, A. D., Matus, I., Castillo, D., Hayes, P., Machado, S., and Corey, A. 2009. Association mapping of plant height, yield, and yield stability in recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. spontaneum as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. Vulgare background. Molecular Breeding 23: 365-376.
20. Jun, T. H., Van, K., Kim, M. Y., Lee, S. H., and Walker, D .R. 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. Euphytica 62: 179-191.
21. Liue, L., Wang, L., Yao, J., Zheng, Y., and Zhao, C. 2010. Association mapping of six agronomic traits on

1- Marker assisted selection

chromosome 4A of wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular Plant Breeding 1 (5): 1-10.
22. Mandel, J. R., Nambeesan, S., Bowers, J. E., Marek, L. F., Ebert, D., Rieseberg, L. H., Knapp, J. M., and Burk, J. M. 2013. Association mapping and the genomic consequence of selection in sunflower. Genetics 9 (3): 1-13.
23. Masirevic, S., and Gulya, T. J. 1992. Sclerotinia and phomopsis-two devastating sunflower pathogens. Field Crops Research 30: 271-300.
24. Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schon, C. C., Knapp, S. J., Tang, S., and Melchinger, A. E. 2004. QTL mapping of Sclerotinia midstalk rot resistance in sunflower. Theoretical and Applied Genetics 109: 1474-1484.
25. Myles, S., Peiffer, J., Brown, P. J., Ersoz, E. S., Zhang, Z., Costich, D. E., and Buckler, E. S. 2009. Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. Plant Cell 21: 2194-2202.
26. Onemli, F., and Gucer, T. 2010. Response to drought of some wild species of Helianthus at seedling growth stage. Helia 33 (53): 45-54.
27. Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
28. Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. Phytopathology 69: 875-880.
29. Rafalski, J. A. 2002a. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current Opinion in Plant Biology 5: 94-100.
30. Rafalski, J. A. 2002b. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. Plant Science 162: 329-333.
31. Rönicke, S., Hahn, V., and Friedt, W. 2005. Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* of 'high oleic' sunflower inbred lines. Plant Breeding 124: 376-381
32. Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A., and Feldman, M. W. 2002. Genetic structure of human populations. Science 298: 2381-2385.
33. Roy, J. K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H. S., and Gupta, P. K. 2006. Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current Science 90: 5-10.
34. Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P., and Negri, V. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. Theoretical and Applied Genetics 122: 1281-1291.
35. Speed, D., Hemani, G., Johnson, M. R., and Balding, D. J. 2012. Improved heritability estimation from genome-wide SNPs. American Journal of Human Genetics 91: 1011-1021.
36. Sukumaran, S., Xiang, W., Bean, S. R., Pedersen, J. F., Kresovich, S., Tuinstra, M. R., Tesso, T. T., Hamblin, M. T., and Yu, J. 2012. Association mapping for grain quality in a diverse sorghum collection. The Plant Genome 5: 126-135.
37. Talukder, I. Z., Hulke, S. B., Qi, L., Scheffler, E. B., Pegadaraju, V., McPhee, K., and Gulya, J. T. 2014. Candidate gene association mapping of Sclerotinia stalk rot resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) uncovers the importance of COI1 homologs. Theoretical and Applied Genetics 127: 193-209.
38. Thornsberry, J. M., Goodman, M. M., Doebley, J., Kresovich, S., and Nielsen, D. 2001. Dwarf8 polmorphisms associate with variation in flowering time. Nature Genetics 28: 286-89.
39. Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M. C., Landi, P., Maccaferri, M., and Conti, S. 2002. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield in drought-stressed maize: case studies, shortcomings and perspectives. Annals of Botany 89: 941-963.
40. Wang, W. Y. S., Barratt, B. J., Clayton, D. G., and Todd, J. A. 2005. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. Nature Reviews Genetics 6: 109-118.
41. Würschum, T., Anyanga, W. O., and Hahn, V. 2014. Inheritance of *Sclerotinia* Midstalk Rot Resistance in Elite Sunflower Breeding Germplasm. Helia 37 (61): 193-203.
42. Yue, B., Radi, S. A., Vick, B. A., Cai, X., Tang, S., Knapp, S. J., Gulya T. J., Miller J. F., and Hu, J. 2008. Identifying quantitative trait loci for resistance to Sclerotinia head rot in two USDA sunflower germplasms. Phytopathology 98: 926-931.
43. Zhu, C., Gore, M., Buckler, E. S., and Yu, J. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. Plant Genome 1: 5-20.

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 16, No. 1, Spring. 2018, p. 83-96

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص. ۹۶-۸۳

Evaluation of Retrotransposon-based Markers for Identification of Genetic Loci Associated with Agro-morphological Characteristics and Resistance to Sclerotinia Basal Stem rotin Oily Sunflower (*Helianthus annuus*L.) under Filed Conditions

R. Paknia[1]- F. Shahriari[2*]- R. Darvishzadeh[3]- S. Malekzadeh[4]
Received: 03-09-2016
Accepted: 01-03-2017

Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the most important crops grown mainly for edible oil. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary is a common and widespread pathogen of sunflower. Sclerotinia stem rot is one of the most damaging diseases of sunflower in world, causing average yield reductions of 10 to 20%. It causes total production loss under favorable environmental conditions. Hence, plant improvement projects must focus on creating of new genotypes with higher resistance against diseases. Resistance to *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary has been described as quantitatively inherited with additive and dominant gene effects. Identification of chromosome regions controlling partial resistance to sclerotinia stem rot can increase understanding about the genetic control of the diseases and developing cultivars with improved partial resistance. In this study, retrotranposon-based molecular markers associated with resistance to disease as well as some important agromorphological traits identified using general and mixed linear models in Tassel software.

Material and Method

A collection of 100 sunflower lines, kindly provided by several research centers in Europe, Iran and the United States, were evaluated using a 10×10 simple lattice design with two replications. Each plot comprised 2 lines 5 m long, with a spacing of 65 × 25 cm between lines and plants, respectively. The experiment was conducted in 2015 at a farm in 'Vaghaslo-e-Sofla' village on Urmia. Five plants per genotype in each replication were inoculated with a fungal isolate collected from naturally infected sunflower plants of this farm in previous year.Some resistant and agronomical traits including percentage of necrotic area after 4, 8, 12 days inoculation, 100 seeds weight of non contaminated plants, 100 seeds weight of contaminated plants, yield per plant in non contaminated plants, yield per plant in contaminated plants, 100 seeds weight loss, and per plant yield loss were measured. The genetic profile of population was prepared with 28 rerotransposon markers.

Result and Discussion

Based on molecular marker data, the studied association panel was subdivided into two subpopulations (K=2). Association analysis using mixed linear model (MLM) identified 27 loci significantly ($P<0.01$) associated with studied traits. Maximum number of markers (5) was identified for percentage of necrotic area after 4 days and yield per plant in contaminated plants. Some common markers were identified for studied traits. Common markers for traits can be due to pleiotropic effects or linkage between genomic regions involved in controlling traits. Results of the current study present useful information about the genetic basis of the studied traits and can be used in different sunflower breeding programs including marker aided selection. In future studies, coding regions of important agronomical and resistance traits could be identified by sequencing loci with highest R^2.

1- PhD in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2- Professor, Department of Plant Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad
3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University
4- Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad
(*- Corresponding Author Email: fshahria@yahoo.com.au)

Conclusions

In sum, 27 loci associated with genomic regions controlling studied agro-morphological and resistant traits were identified. By converting identified retrotranspos-based molecular markers to SCAR, it is possible to use them directly in breeding activities such as identification of appropriate parents for developing mapping population, developing hybrid cultivars as well as marker assisted selection programs.

Keywords: Association mapping, Linkage disequilibrium, Molecular marker, Population structure, Sunflower